

TRANSLATION CERTIFICATION

We, **AD-EX WORLDWIDE**, an industrial translation service founded in 1957, domiciled at 525 Middlefield Road, Suite 150, Menlo Park, California 94025-3458, USA, do hereby certify that:

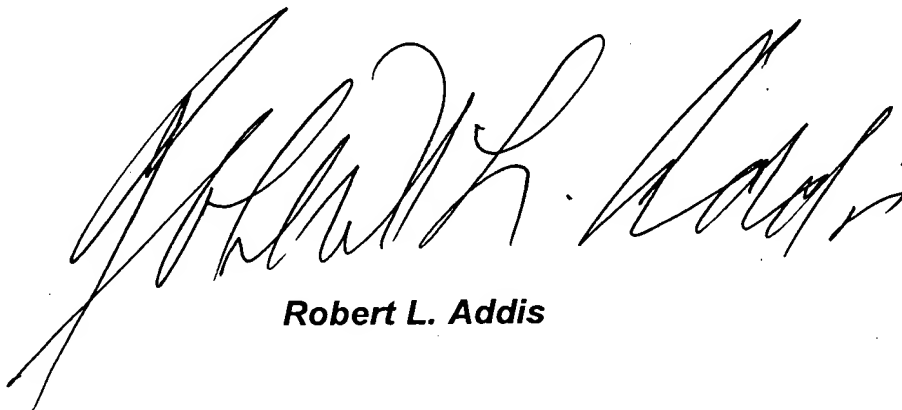
- we are internationally recognized professional translators from Japanese into English;
- we have been serving the public in that capacity since 1957;
- the attached 9-page English text, each of whose pages is identified by JP(A)60-242368, is a translation from Japanese to English entirely performed by us;
- said English translation from Japanese constitutes a complete and accurate description of the entire meaning of the printed portions of the original Japanese-language text identified as

Japanese Patent Application Public Disclosure No. 60-242368
(a 5-page document with pages numbered from 407 to 411)

of which a copy is appended to this English translation.

So declared with such exceptions as may be indicated in the translation.

Thus certified for and on behalf of **AD-EX Worldwide** by its Certifying Officer:

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to read 'Robert L. Addis', is written over the printed name.

Robert L. Addis

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-242368

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)12月2日

G 01 N 33/50

P-8305-2G

C 12 N 15/00

7115-4B

C 12 Q 1/58

8213-4B ※審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 核酸塩基配列決定方法

⑯ 特 願 昭59-96454

⑰ 出 願 昭59(1984)5月16日

⑱ 発 明 者 原 田 義 則 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 嶋 田 保 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 神 原 秀 記 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 発 明 者 永 井 啓 一 国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉒ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉓ 代 理 人 弁理士 高橋 明夫 外1名

最終頁に続く

明 細 書

発明の名称 核酸塩基配列決定方法

特許請求の範囲

1. テオキシリボ核酸(DNA)試料を4分割し、それぞれに異なる励起波長を有するけい光色素を結合し、その後、塩基特異的化学反应を行ない、単一の泳動路による電気泳動法で解析することを特徴とする核酸塩基配列決定方法
2. 前記けい光色素が異なる発光スペクトルを有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の核酸塩基配列決定方法。
3. 前記けい光色素の結合処理を前記化学反应の後に行なうことを特徴とする第1項又は第2項記載の核酸塩基配列決定方法。
4. 解析を液体クロマトグラフィーで行なうことを特徴とする第1項ないし第3項記載の核酸塩基配列決定方法。

発明の詳細な説明

(発明の利用分野)

本発明はデオキシリボ核酸(DNA)塩基配

列決定方法に係り、特にその高精度化、高速化に好適なDNAの検出および分離できる核酸塩基配列決定方法に関する。

(発明の背景)

DNA断片混合物を電気泳動法により分離し、分子量の大小順に整列させ、これを検出する際、従来は、DNA分子の末端を泳動前に³²P、³³Sなどの放射性同位体や、ビオチン系の蛍光色素で標識したり、あるいは泳動分離後、銀(蛋白質・核酸・酵素)やエチジウム・ブロミド、アクリジンオレンジ、プロフラビンなどの蛍光色素(蛋白質・核酸・酵素別冊：蛍光測定の実験と生体系への応用、pp206-231)で染色したりしてDNA断片の泳動分離帯を検出したが、いずれも塩基種識別可能な染色法ではなかった。

それゆえ、従来のDNA塩基配列決定法

(Methods in Enzymology, 65, pp449-580)

では、DNA断片に4種以上の塩基特異的DNA鎖切断反応ないしは塩基特異的相補鎖合成停止反応を行つた後でも、核酸断片の電気泳動分離に際

し、反応種ごとに泳動路を別にする必要があった。

第1図(a)に従来法によるA, C, G, T, 4種の塩基特異的反應の反應生成物を電気泳動分離した時の模式図を示す。この場合、標識法固有の検出法で泳動帯を検出し、移動度の大小順にどの泳動路で検出されたかでDNA塩基配列を決定する。本例では、TGCAACGATTGGCATGACGである。ところが、従来の電気泳動法による泳動分離像には、泳動条件不適による第1図(b)に示すような歪の生ずる場合が多く、移動度の大小順の判定、すなわち塩基配列決定に困難があった。

〔発明の目的〕

本発明の目的は、多種の塩基特異的反應を施したDNA断片を混合し、これを単一泳動路を使用した電気泳動法、あるいは、液体クロマトグラフィー法を用いて種々の移動度を有すDNA断片に分離することによりDNA塩基配列決定の高精度化、簡便化、高速化を可能とする方法を提供することにある。

〔発明の概要〕

源を設ける。

(5) 前記(1)(2)の標識用蛍光色素として、発光スペクトルの異なるものを使用した場合には、発光スペクトルを分光するための分光装置、あるいはフィルターと受光装置を設ける。

〔発明の実施例〕

以下、本発明の一実施例を第2図により説明する。第2図(a)は、本発明によりエテノ化ヌクレオチドなどの4種の蛍光色素を用いて作成された単一泳動路上の塩基特異的反應毎のDNA断片並列像(質量スペクトル)を示す。すなわち、本実施例によれば、DNA鎖切断反応ないしは、DNA相補鎖合成反応により生成したDNA断片は、励起波長あるいは、最大発光波長の異なる4種の蛍光色素で標識されているので、混合物として単一泳動路で分離しても標識法に対応する検出法(異った波長で励起するか、発光スペクトルを分光する)を採用すると、4種の反應生成物の質量スペクトルを個別に解析できる。単一泳動路を用い、同一条件下で泳動しているの、第1図

塩基特異的反應生成物を反應ごとに独立に分離することに起因するDNA断片泳動帯の相対的位置關係の不確実性をなくすため、本発明では次の手段によつてDNA塩基配列決定の高精度化、簡便化、高速化を行おうとするものである。

(1) 4種の塩基特異的DNA鎖切断反應、あるいは相補鎖合成反應工程に先立つて4種の反應生成物を区別できるよう核酸試料を2から4種の性質の異つた蛍光色素で標識する(4種の物質を区別するためには、最低2種の独立な標識物が必要である)。

(2) 又は、4種の塩基特異的DNA鎖切断反應、あるいは、相補鎖合成反應の後に、4種の反應が区別できるよう核酸試料を2から4種の性質の異つた蛍光色素で標識する。

(3) 前記(1)(2)の塩基特異的反應生成物を、電気泳動法または高速液体クロマトグラフィー法で分子量分離する。

(4) 前記(1)(2)の標識用蛍光色素として、励起波長の異なる色素を用いた場合、対応する数の光

(b)に示したような、泳動分離像の歪が、たとえ生じて、泳動帯間の相対的位置關係は正しく保たれるので、高精度のDNA塩基配列決定が行える。

図2(b)は、2種の蛍光色素を用いて作成された塩基特異的反應毎のDNA断片の質量スペクトルを示す。本実施例によれば、DNA鎖切断反應、あるいはDNA相補鎖合成反應により生成したDNA断片のうち、A, C反應生成物は色素1で、A, G反應生成物は色素2で、標識されているので、4種の反應生成物を混合し、同一泳動路上で泳動分離した後標識法に対応する検出法で検出すると、4種の検出結果が得られる。すなわち、色素1と2により染色される泳動帯、(これを(+, +)と略記)の他に、(+, -), (-, +), (-, -)となる泳動帯が存在する。本例では、それぞれがA, C, G, Tに対応するので、質量スペクトルを解釈できる。また、本実施例でも、核酸断片混合物と同一泳動路を使用し、同一条件下で泳動しているの、第1図(b)に示す

ような、泳動分離像の歪が生じても質量スペクトルの解釈に困難は生じない。そのため、高精度のDNA塩基配列決定が行える。

以上、2実施例より、3種の蛍光色素を用いた場合でも、4種の反応生成物の識別が可能であることは自明である。

第3図は、2通りの蛍光標識方((I)励起波長の違いを利用、(II)蛍光スペクトルの違いを利用)と、2通りの質量スペクトル作成法((I)電気泳動法、(II)液体クロマトグラフィー)との組合せによる4通りの装置を示す。第3図(a)は、4種の塩基特異的の反応生成物を識別するために、それらを個別に励起波長の異なる蛍光色素で標識し12、混合し1、単一泳動路2、で分離した後、泳動分離帯3を異なる波長($\lambda_1 \sim \lambda_4$)で順次励起し放出される蛍光を検出7する。励起信号と発光との時間関係を解析すれば、蛍光を分光しなくてもいかなる塩基特異的の反応の結果生じたDNA断片であるのか容易に判定できるので、この方法により、順次現われる泳動帯を測定して行き、

DNA塩基配列を決定できる。第3図(b)は、DNA断片の質量スペクトル作成法として、電気泳動法のかわりに液体クロマトグラフィーを利用した場合の実施例である。効果は(a)に同じである。第3図(c)は、4種の塩基特異的の反応生成物を識別するために、それらを個別に連続光あるいは単一波長による励起に対し発光スペクトルの異なる4種の蛍光色素で標識し13、混合して1、単一泳動路2、で分離した後、特定波長で色素を励起し、泳動分離帯を分光8し、検出7する。分光するかわりにフィルターを用いても良い。本方式では、上記の2実施例に比べ励起光源部が単純になる。第2図(d)は、DNA断片の質量スペクトル作成法として液体クロマトグラフィーを利用した場合の実施例である。効果は(c)に同じである。

以上述べた実施例では、いずれもDNA断片は、電気泳動分離前に、すでに蛍光色素により標識されているものとし、それ以前に終了しておく可き標識反応工程と、塩基特異的の反応工程の時間的前

後関係、及び蛍光色素が有すべき性質についてはふれなかつたので、以下、それらの関係について述べる。まず、標識反応を塩基特異的の反応に先立つて行う場合には、本発明は常に適用可能であるが、このとき蛍光色素は、DNA断片に共有結合で結合し、塩基特異的の反応に対し耐性でなければならない。エテノアデノシン等エテノ化塩基は、この性質を有する。一方、標識反応を塩基特異的の反応後行う場合には、塩基特異的の反応の種類によつては、本発明が適用できない場合がある。すなわち、塩基特異的の反応として相補鎖合成反応

(Methods in Enzymology, 65, pp. 560-580)を採用した場合には、反応後生成するDNA断片は、いずれもが、DNA塩基配列決定に対し、有意義な情報を担っているもので、これらを蛍光色素により標識し質量スペクトルを作成できる。この場合、色素に求められる要件はDNAの特異的結合のみで共有結合を形成させる必要はないので上記要件より条件は緩い。しかし、塩基特異的DNA鎖切断反応(Methods in Enzymology, 65, pp.

499-560)を採用した場合には、生成するDNA断片中、DNA塩基配列決定に対し有意義な情報を担ったものは全体の1/4以下で、これのみを選択的に標識することは不可能なので本発明は適用できない。

〔発明の効果〕

本発明によれば、DNA断片の分子量分離による質量スペクトルを作成する際、いくつかの反応生成物を、同時に、同一条件下で分離できるので、スペクトルの高精度解析が可能となる。その結果、DNA塩基配列決定の自動化、高精度化が可能となる。

図面の簡単な説明

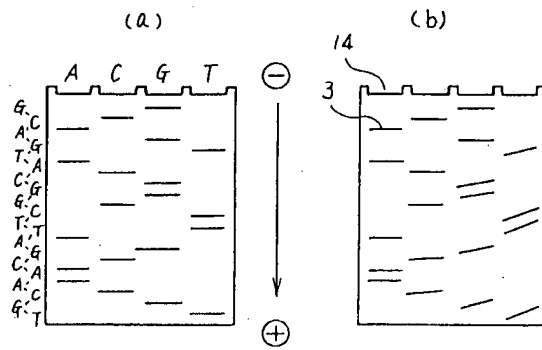
第1図および第2図は本発明の一実施例の有効性を示す説明図、第3図は本発明の4通りの実施例を示す説明図である。

1…標識済DNA断片混合物、2…電気泳動支持体、3…泳動分離帯、4…高圧直流電源、5…励起光源、6…光導ケーブル、7…光検出器、8…分光器、またはフィルター、9…送液ポンプ、

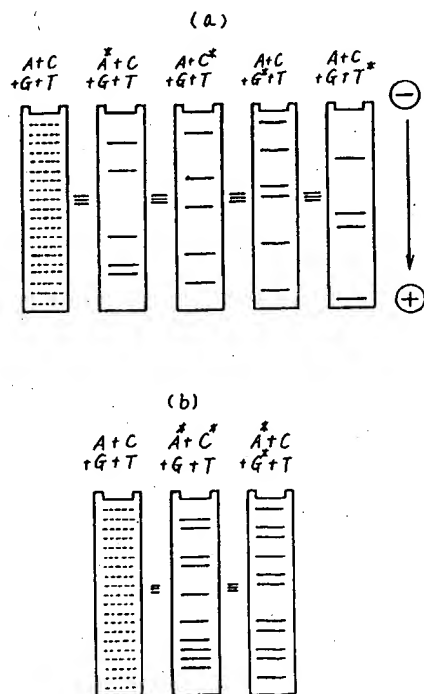
10…液体クロマトグラフィー用カラム、11…
検出用セル、12…励起波長の異なる蛍光色素に
よる染色槽、13…発光スペクトルの異なる蛍光
波長を有する蛍光色素による染色槽、14…泳動
路。

代理人 井理士 高橋明夫

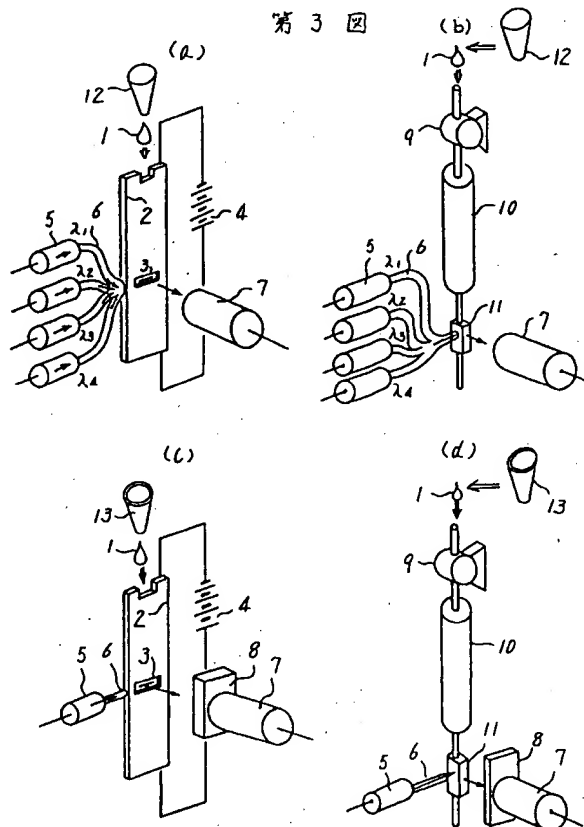
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 4

G 01 N 21/76
33/52

識別記号

庁内整理番号

6637-2G
8305-2G

⑥発 明 者 鶴 田 二 郎 国分寺市東恋ヶ窪 1 丁目 280 番地 株式会社日立製作所中
央研究所内